

# 脊髓神经元型一氧化氮合酶在大鼠神经病理性痛中的作用

张丽 孙涛 傅志俭 宋文阁 贾明睿 魏广福

**【摘要】** 目的 探讨脊髓神经元型一氧化氮合酶(nNOS)在大鼠神经病理性痛中的作用。方法 健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重 220~280 g,采用结扎坐骨神经干的方法建立坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)模型。随机分为 4 组( $n=10$ ),I 组及 II 组暴露坐骨神经干,分别于术后 1 d 开始鞘内注射选择性 nNOS 抑制剂 7-NI 60  $\mu\text{g}$  [溶于 20% 二甲亚砜(DMSO)]10  $\mu\text{l}$ 、20% DMSO 10  $\mu\text{l}$ ,1 次/d,连续 6 d; III 组及 IV 组制备 CCI 模型,分别于术后 1 d 开始鞘内注射 7-NI 60  $\mu\text{g}$  (溶于 20% DMSO 10  $\mu\text{l}$ )、20% DMSO 10  $\mu\text{l}$ ,1 次/d,连续 6 d。分别于 CCI 前 1 d、CCI 后 1、3、5、7 d 时测定大鼠机械痛阈和热痛阈。于 CCI 后 7 d,各组分别取 5 只大鼠,取术侧 L<sub>4-6</sub> 背根神经节,分别采用实时定量 PCR 和 Western blot 法测定 nNOS mRNA 及蛋白的表达水平。结果 与 I 组和 II 组比较,T<sub>1-4</sub> 时 III 组和 IV 组术侧后肢机械痛阈和热痛阈降低( $P<0.05$ ),背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达上调( $P<0.05$ );与 III 组比较,T<sub>1-4</sub> 时 IV 组机械痛阈和热痛阈降低,背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达上调( $P<0.05$ )。结论 脊髓 nNOS 参与了大鼠神经病理性痛的形成。

**【关键词】** 神经痛; 注射,脊髓; 一氧化氮合酶

**Role of spinal neuronal nitric oxide synthase in neuropathic pain in rats** ZHANG Li, SUN Tao, FU Zhijian, SONG Wen-ge, JIA Ming-rui, WEI Guang-fu. Department of Pain Management, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan 250021, China  
Corresponding author: FU Zhijian, Email: zhijian-fu@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of spinal neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in neuropathic pain in rats. **Methods** Male SD rats weighing 220-280 g were used in this study. The rats were implanted with chronic intrathecal (IT) catheters. Forty rats with normal motor function were randomly divided into 4 groups ( $n=10$  each): group I sham operation + 7-nitorindaxole (7-NI); group II sham operation + DMSO; group III CCI + 7-NI and group IV CCI + DMSO. Neuropathic pain was induced by chronic constrictive injury (CCI). Right sciatic nerve was exposed and 4 ligatures were placed on the sciatic nerve at 1 mm intervals with 4-0 chromic catgut. In sham operation groups right sciatic nerve was exposed but not ligated. In group I and III 7-NI (a selective nNOS inhibitor) 60  $\mu\text{g}$  in 20% DMSO 10  $\mu\text{l}$  was injected IT once a day for 6 consecutive days while in group II and IV only the solvent 20% DMSO 10  $\mu\text{l}$  was injected IT instead of 7-NI. Paw withdrawal threshold (PWT) to mechanical stimulation with von Frey filaments and paw withdrawal latency (PWL) to radiant heat were measured before operation (baseline) and at 1, 3, 5, 7 d after operation. Five animals in each group were killed on the 7th day after operation after last pain threshold measurement. The dorsal root ganglions (DRGs) of the lumbar segment (L<sub>4-6</sub>) were removed for determination of the expression of nNOS mRNA (by RT-PCR) and protein (by Western blot). **Results** CCI significantly decreased the mechanical and thermal pain thresholds and increased the expression of nNOS mRNA and protein in the ipsilateral DRGs. IT 7-NI administration significantly suppressed the expression of nNOS in the lumbar DRGs and significantly attenuated CCI-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. **Conclusion** The spinal nNOS is involved in the formation of neuropathic pain.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2010.02.013

基金项目:国家自然科学基金(30801072);山东省自然科学基金(Q2007C14)

作者单位:250012 济南市,山东大学附属省立医院疼痛科

通信作者:傅志俭,Email: zhijian-fu@163.com

**【Key words】** Neuralgia; Injections, spinal; Nitric oxide synthase

神经元型一氧化氮合酶(nNOS)是神经组织 NO 合成的关键酶,参与突触可塑性、宿主防御及信号转导等多种病理生理学过程<sup>[1-2]</sup>。研究显示,神经和软组织损伤引起的慢性痛可导致中枢敏化,nNOS 在其中起重要作用<sup>[3]</sup>。另有研究显示,坐骨神经结扎处给予非特异性 NOS 抑制剂 L-NAME 可抑制外周神经损伤导致的脊髓 nNOS 激活,减轻神经病理性痛<sup>[4]</sup>。本研究拟探讨脊髓 nNOS 在大鼠神经病理性痛中的作用。

### 材料与方 法

**动物选择及鞘内置管** 健康雄性 SD 大鼠,体重 220~280 g,购自山东大学医学院实验动物中心,自由进食水,适应环境 1 周后,参照文献[5]介绍的方法,腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉下,暴露 L<sub>3,4</sub>黄韧带,置入 PE-10 导管(内径 0.28 mm,外径 0.61 mm),见脑脊液缓慢滴出,确定鞘内置管成功。

**坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)模型的建立** 于鞘内置管后第 4 天,参照文献[6]介绍的方法,腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉下,常规消毒右下肢,于股外侧纵行切开皮肤,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,于神经分叉前游离坐骨神经干约 7 mm,光镜下采用 4-0 铬制肠线松扎 4 处,间隔 1 mm,松紧程度以引起小腿肌肉轻微颤动且不影响外膜血流灌注为宜。逐层缝合,术后肌肉注射青霉素 8 万单位,2 次/d。

**动物分组及处理** 取鞘内置管成功的大鼠 40 只,随机分为 4 组( $n=10$ ),I 组及 II 组仅暴露坐骨神经干,分别于术后 1 d 开始鞘内注射选择性 nNOS 抑制剂 7-NI(Calbiochem 公司,美国) 60  $\mu\text{g}$ [溶于 20%二甲基亚砜(DMSO)10  $\mu\text{l}$ ]、7-NI 的溶媒 20% DMSO (Sigma 公司,美国)10  $\mu\text{l}$ ,1 次/d,连续 6 d; III 组及 IV 组制备 CCI 模型,分别于术后 1 d 开始鞘内注射 7-NI 60  $\mu\text{g}$ (溶于 20% DMSO 10  $\mu\text{l}$ )及 20% DMSO 10  $\mu\text{l}$ ,1 次/d,连续 6 d。

**机械痛阈的测定**<sup>[7]</sup> 各组分别于 CCI 前 1 d ( $T_0$ )、CCI 后 1 d( $T_1$ )、3 d( $T_2$ )、5 d( $T_3$ )、7 d( $T_4$ )时采用 von Frey 丝(Stoelting 公司,美国)刺激大鼠双后足,测定机械痛阈。将大鼠置于有机玻璃罩内,底部为金属筛网。待大鼠安静 15 min 后,采用不同压力的纤维丝(压力值由小到大)垂直刺激大鼠双侧足底中部,每次刺激持续 6~8 s,待大鼠出现抬足或舔足

行为视为阳性反应,以引起 50%阳性反应的压力作为机械痛阈。每次刺激间隔 30 s。

**热痛阈的测定**<sup>[8]</sup> 于各时点机械痛阈测定完毕后,测定大鼠热缩足反射潜伏期,以其表示热痛阈。将大鼠置于底部玻璃板为 3 mm 厚的有机玻璃箱中,适应 30 min 后用 BME-410A 热痛刺激仪(中国科学院生物医学工程公司)照射足底部,记录从照射开始至大鼠出现抬后肢回避的时间,以该时间表示热缩足反射潜伏期。照射时间不超过 30 s,间隔 5 min。连续测定 3 次,取其平均值。

**实时定量 PCR 法测定 nNOS mRNA 的表达** 于  $T_4$  时痛阈测定完毕后各组随机取 5 只大鼠,断头处死,取术侧 L<sub>4-6</sub>背根神经节,液氮冷冻后 -80℃ 保存备用。参照 GenBank 中 nNOS 的基因序列,采用 Primer 5.0 软件自行设计引物,并由上海生工生物工程公司合成。nNOS 引物序列:上游引物 5'-GCAT CACCCTGTCTTCCAC-3',下游引物 5'-TGCCAATTC TTAAAGCCGATA-3',产物长度 149 bp。GAPDH 引物序列:上游引物 5'-TGGAGAAACCTGCCAAGTATGA-3',下游引物 5'-TGGAAGAATGGGAGTTGCTGT-3',产物长度 135 bp。严格按照 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国)及逆转录试剂盒(Fermentas 公司,立陶宛)说明书操作提取总 RNA 后逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行荧光定量。采用 SYBR Green (ABI 公司,美国)于 20  $\mu\text{l}$  反应体系中扩增 cDNA。每个反应管包括:SYBR Green 10  $\mu\text{l}$ ,上、下游引物 5  $\mu\text{l}$ ,cDNA 5  $\mu\text{l}$ 。反应条件:50℃ 孵育 2 min,95℃ 激活酶 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。反应在 Applied Biosystems 7500 PCR 仪上进行。反应结束后,电脑自动分析荧光信号,并将其转换为各目的基因的起始拷贝数和  $C_T$  值。为控制各样本间 mRNA 的差异,同时检测管家基因 GAPDH 表达。每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照,每一样本设 4 个复孔。结果采用 SDS 软件进行  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法相对定量分析,以管家基因 GAPDH 的  $C_T$  值标准化目的基因  $C_T$  值,得到目的基因初始模板相对量,以目的基因初始模板相对量与 CCI 前目的基因初始模板相对量的比值表示 nNOS mRNA 的表达水平。

**Western blot 法测定 nNOS 蛋白的表达** 于  $T_4$  时痛阈测定完毕后各组随机取 5 只大鼠,断头处死,取术侧 L<sub>4-6</sub>背根神经节,按 1 ml/100 mg 的比例加入预

冷的组织细胞裂解液,匀浆,4℃下 12 000 × g,离心 10 min,取上清液。以 BSA 为标准蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。在样品处理液中加入上样缓冲液,于 100℃水浴锅中加热 5 min 使蛋白变性。40 μg 总蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离,用半干转移电泳仪将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h,滴加兔抗鼠 nNOS 一抗(1:250, Santa Cruz 公司,美国),4℃过夜;TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:200),室温孵育 1 h;再用化学发光底物孵育,最后将硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光,冲洗。所得结果扫描后用 Quantity one V4.62 软件(Bio-Rad 公司,美国)进行分析,以 nNOS 灰度值与内参照 β-actin 灰度值的比值表示 nNOS 蛋白的表达水平。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

Ⅲ组和Ⅳ组术后均出现术侧足内收,后足轻度外翻和跛行,术侧足着地时间较健侧明显缩短,且Ⅳ组出现明显的舔足、抖动等表现。Ⅰ组及Ⅱ组未见术侧足内收和运动功能障碍。

$T_0$  时各组术侧后肢机械痛阈和热痛阈比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); $T_{1-4}$  时Ⅰ组和Ⅱ组术侧后肢机械痛阈和热痛阈差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与Ⅰ组、Ⅱ组比较, $T_{1-4}$  时Ⅲ组和Ⅳ组术侧后肢机械痛阈和热痛阈降低( $P < 0.05$ );与Ⅲ组比较, $T_{1-4}$  时Ⅳ组术侧后肢机械痛阈和热痛阈降低( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠术侧后肢机械痛阈及热痛阈的比较  
( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

指标	组别	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$
机械痛阈 (g)	Ⅰ组	27.7 ± 2.4	26.8 ± 3.2	25.4 ± 4.1	26.0 ± 3.3	25.2 ± 2.3
	Ⅱ组	27.9 ± 2.8	25.8 ± 4.2	26.3 ± 3.4	24.2 ± 4.1	23.1 ± 3.1
	Ⅲ组	27.3 ± 3.2	19.1 ± 3.5 <sup>a</sup>	17.8 ± 4.1 <sup>a</sup>	15.7 ± 2.9 <sup>a</sup>	16.5 ± 3.3 <sup>a</sup>
	Ⅳ组	26.4 ± 3.3	14.9 ± 3.0 <sup>a</sup>	8.1 ± 4.1 <sup>b</sup>	6.6 ± 2.0 <sup>b</sup>	5.6 ± 3.5 <sup>b</sup>
热痛阈 (s)	Ⅰ组	18.4 ± 1.8	17.8 ± 2.0	16.5 ± 2.0	17.0 ± 2.5	17.5 ± 2.5
	Ⅱ组	18.6 ± 2.3	16.6 ± 2.5	17.2 ± 2.6	17.3 ± 2.0	16.9 ± 1.7
	Ⅲ组	18.2 ± 2.3	13.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	11.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	11.2 ± 2.5 <sup>a</sup>	12.8 ± 2.1 <sup>a</sup>
	Ⅳ组	18.5 ± 2.5	10.1 ± 2.1 <sup>b</sup>	6.7 ± 2.4 <sup>b</sup>	5.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	7.8 ± 1.9 <sup>b</sup>

注:与Ⅰ组和Ⅱ组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$  与Ⅲ组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

Ⅰ组和Ⅱ组术侧背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与Ⅰ组、Ⅱ组比较,Ⅲ组和Ⅳ组术侧背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达上调( $P < 0.05$ );与Ⅲ组比较,Ⅳ组术侧背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达上调( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠术侧背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 表达水平的比较( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

指标	Ⅰ组	Ⅱ组	Ⅲ组	Ⅳ组
nNOS 蛋白	0.32 ± 0.09	0.43 ± 0.12	0.89 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.18 <sup>a</sup>
nNOS mRNA	1.54 ± 0.24	2.13 ± 0.15	4.27 ± 0.38 <sup>a</sup>	5.11 ± 0.43 <sup>a</sup>

注:与Ⅰ组和Ⅱ组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$  与Ⅳ组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

本研究依据文献[9]所用鞘内注射 7-NI 的剂量并结合预实验结果,选择鞘内注射 7-NI 60 μg 进行实验。

本研究中Ⅲ组和Ⅳ组大鼠术侧后肢机械痛阈及热痛阈均明显降低,且有术侧足内收及跛行等行学表现,表明 CCI 模型制备成功。

本研究结果显示,鞘内注射 7-NI 后Ⅲ组大鼠术侧背根神经节 nNOS 蛋白及 mRNA 的表达均明显下调,且术侧后肢机械痛阈及热痛阈均明显升高,提示鞘内注射 7-NI 可减轻大鼠神经病理性痛,其机制可能与抑制 nNOS 合成有关。

神经病理性痛常表现为自发痛、痛觉过敏及触诱发痛,其发病机制可能与 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体和 NO 等有关。NO 在脊髓水平参与痛觉过敏的发生和发展,其与兴奋性氨基酸、促炎因子、前列腺素及 P 物质等多种因子相互作用,增强痛觉信号在脊髓背角的调控,诱发神经病理性痛的产生。研究显示,鞘内注射 NO 供体硝酸甘油可呈剂量依赖性地增加福尔马林诱发的神经病理性痛<sup>[10]</sup>;腹腔注射 NO 供体,大鼠可发生痛觉过敏,并于给药后 2~3 h 达高峰<sup>[11]</sup>。上述研究结果提示,NO 与神经病理性痛的产生关系密切。一氧化氮合酶是 NO 合成的主要限速酶。坐骨神经受到机械压迫后,刺激背根神经节 C 类神经纤维可使初级传入神经纤维去极化,释放兴奋性氨基酸,作用于 NMDA 受体,使  $Ca^{2+}$  内流,激活多种蛋白激酶,导致 nNOS 活化,催化 L-精氨酸生成 NO,诱发神经病理性痛的产生<sup>[12]</sup>。鞘内注射选择性 nNOS 抑制剂 7-NI 可抑制背根神经节 nNOS 活性,减少 NO 合成,抑制脊髓水平痛觉信号转导,从而抑制神经病理性痛的产生。

综上所述,脊髓 nNOS 参与了大鼠神经病理性痛的形成。

### 参 考 文 献

- [1] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, 2001, 64(1):51-68.
- [2] Clasadonte J, Poulain P, Beauvillain JC, et al. Activation of neuronal nitric oxide release inhibits spontaneous firing in adult gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible local synchronizing signal. *Endocrinology*, 2008, 149(2):587-596.
- [3] 黄长盛,王铮,郭曲练,等.鞘内注射 PSD-93 反义寡核苷酸对神经病理性痛大鼠脊髓 nNOS 的影响. *中华麻醉学杂志*, 2008, 28(6): 511-514.
- [4] Thomas DA, Ren K, Bease D, et al. Application of nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine methyl ester, on injured nerve attenuates neuropathy-induced thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett*, 1996, 210(2):124-126.
- [5] Mabuchi T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, et al. Attenuation of neuropathic pain by the nociceptin/orphanin FQ antagonist JTC-801 is mediated by inhibition of nitric oxide production. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(7):1384-1392.
- [6] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33(1):87-107.
- [7] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [8] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [9] Guan Y, Yaster M, Raja SN, et al. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain*, 2007, 3: 29.
- [10] Takano Y, Kuno Y, Sato E, et al. Hyperalgesia induced by intrathecal administration of nitroglycerin involves NMDA receptor activation in the spinal cord. *Masui*, 1997, 46(10): 1354-1361.
- [11] Naik AK, Tandan SK, Kumar D, et al. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*, 2006, 530(1-2):59-69.
- [12] 孟保华,孟宪丽.疼痛治疗的信号转导机制研究进展. *四川生理科学杂志*, 2007, 29(4):166-170.

(收稿日期:2009-06-27)

(本文编辑:田慧艳)

·读者·作者·编者·

## 统计学处理的有关要求

1. 统计设计及方法描述 应交代统计设计的名称和主要方法。统计设计按照在研究过程中是否对研究对象施加干预分为调查设计和实验设计,后者又可根据研究对象的不同分为实验研究和临床试验;临床试验根据研究或观察过程的时间顺序分为回顾性研究和前瞻性研究。实验设计应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计还应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。应写明所用统计分析方法的具体名称,如成组  $t$  检验、配对  $t$  检验、单因素方差分析、双因素方差分析、重复测量设计的方差分析、 $\chi^2$  检验、秩和检验等。

2. 资料的表达与描述 采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表达服从正态分布的计量资料,采用中位数(四分位数间距)  $[M(Q)]$  表达服从偏态分布的计量资料;采用统计表时,应合理安排纵、横标目,并将数据的含义表达清楚;采用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使坐标轴上刻度值的标法符合数学原则;采用相对数时,分母不宜小于 20,注意区分比和率。

3. 统计分析方法的选择 对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验或秩和检验;对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达 在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般选用  $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  三种表达方式,无须再细分为  $P < 0.001$  或  $P < 0.0001$ ;当  $P < 0.05$  或  $0.01$  时,应描述为比较组之间的差异有统计学意义,而不再描述为有显著性(或非常显著性)差异。当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,还应给出其 95% 可信区间。

本刊编辑部